

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
Escuela Académico Profesional de Farmacia y Bioquímica

**EVALUACIÓN DE LA ADICIÓN DE UN INÓCULO
PARA ESTIMULAR
A ESCALA DE LABORATORIO LA
BIODEGRADACIÓN DE
EFLUENTES GRASOS**

TESIS
PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTOR

Br. LOURDES ROCÍO HUANÉ JAMANCA

Br. RONIE GILBERT RIVERA REYES

Lima – Perú

2014

El presente trabajo de tesis esta dedicado a:

Mis padres, Tomás y Esperanza, por su apoyo incondicional durante toda mi vida universitaria y personal.

Mis hermanos, Walther y Johan, por estar alentándome siempre con sus consejos y dándome ánimos en cada etapa de mi vida.

Mi Esposo Ronie y mis hijos Mariano y Mauricio, por su paciencia y el amor que me brindan siempre.

Lourdes R.H.J.

AGRADECIMIENTOS

A los miembros del jurado examinador por su colaboración en la culminación de este proyecto.

A nuestro buen amigo Julio Ruiz, por apoyarnos con sus alcances y colaboración incondicional.

A nuestros familiares que de una u otra manera alentaron a finalizar este trabajo.

A la Cátedra de Microbiología por facilitarnos el uso de sus instalaciones y equipos para la realización de nuestro proyecto.

El presente trabajo de tesis fue financiado
parcialmente por el Vicerrectorado de Investigación
de la UNMSM (código de proyecto 030401057)

INDICE

	Pág.
RESUMEN	1
SUMMARY	2
INTRODUCCIÓN	3
I. GENERALIDADES	6
II. PARTE EXPERIMENTAL	31
III. RESULTADOS	38
IV. DISCUSIÓN	42
V. CONCLUSIONES	46
VI. RECOMENDACIONES	47
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
VIII. ANEXOS	59

RESUMEN

El presente trabajo investigó la adición de un inóculo de *Pseudomonas aeruginosa* en ciertos efluentes grasos recolectados de locales de expendio de comida rápida. Se consideró evaluar el comportamiento del inóculo en un medio apropiado que estimule o facilite la biodegradación de lípidos como parte de un futuro proceso de tratamiento de desechos. Para esto se utilizó el método de titulación con NaOH 0.05 N mediante el cual se cuantificó la cantidad de ácidos grasos liberados debido a la actividad de las lipasas de *Pseudomonas*. Los parámetros a evaluar fueron: temperatura, tiempo de incubación, pH inicial, concentración de sales y cantidad de inóculo (% V/V). Se comprobó que los mejores resultados (0,823, 0,747 y 0,781 U) se dieron con una temperatura de 37 °C, un tiempo de 24 h y un pH inicial de 7. Los resultados mostraron que con tiempos mayores a 24 h (48 y 72 h) la actividad de enzima decrece y esto puede ser debido a la acción de otras enzimas por medio de las cuales *Pseudomonas* consume también los ácidos grasos liberados y por consiguiente se reduce la cantidad de NaOH usada para el punto final.

Palabras clave: Efluentes grasos, Tratamiento de desechos grasos, *Pseudomonas aeruginosa*, lipasas.

SUMMARY

The present work investigated the addition of an inoculum of *Pseudomonas aeruginosa* in certain fatty effluents collected from local fast food outlets. It was considered to evaluate the behavior of inoculum in an appropriate medium to encourage or facilitate the biodegradation of lipids as part of a subsequent process of waste treatment. For this, the method of titration with 0.05 N NaOH whereby the amount of liberated fatty acids are quantified due to the activity of lipase from *Pseudomonas* are employed. The evaluated parameters were: temperature, incubation time, initial pH, salt concentration and amount of inoculum (% V/V). It was found that the best results (0.823, 0.747 and 0.781 U) were given with a temperature of 37 ° C, time 24 h and an initial pH of 7. The results showed that with longer times at 24 h (48 and 72 h) decreases enzyme activity and this may be due to the action of other enzymes by means of which also consumes *Pseudomonas* released fatty acids and therefore the amount of NaOH used for the endpoint is reduced.

Key words: Fatty effluents, fatty waste treatment, *Pseudomonas aeruginosa*, lipases.

INTRODUCCIÓN

La importancia que tiene la conservación de recursos naturales ha despertado en la sociedad la búsqueda de soluciones para cuidarlos y recuperarlos con el fin de que sean aprovechados por los seres vivos. Las grasas y aceites de desecho hoy en día forman parte de los contaminantes que más afecta al medio acuático cuando se desecha a través del alcantarillado y llegan al mar sin tratamiento adecuado.

En sociedades modernas el manejo apropiado de las aguas residuales es una necesidad no una opción. Las aguas residuales usualmente no son compatibles con los límites establecidos por la autoridad correspondiente¹. Muchos efluentes industriales requieren pre tratamiento para remover las sustancias incompatibles antes de descargarlos a los sistemas de alcantarillado. Los lípidos (representados mayoritariamente por aceites, grasas y ácidos grasos de cadena larga) son componentes orgánicos importantes en aguas residuales que significan un gran problema en el tratamiento y como contaminante de los ecosistemas acuáticos.² La demanda global en el consumo de aceite vegetal se incrementó rápidamente (3.5%) entre los años 1980 y 2000; lo que ha sido relacionado también con la contaminación ambiental debido a su descarga indiscriminada al medio ambiente, sin un tratamiento previo, por encima de los límites permitidos.³ Los principales constituyentes de los lípidos (aceites y grasas) residuales son los aceites vegetales y las grasas animales usados en restaurantes y procesos industriales; que se componen de triglicéridos y ácidos grasos libres.⁴

En la mayoría de países desarrollados se tratan las aguas residuales en un porcentaje elevado, en 1991 la unión Europea creó un plan para el tratamiento de aguas residuales urbanas, teniendo como resultado que el 60 % de la población estuviera conectado a algún sistema de depuración; para el año 2005 esta cifra paso a ser el 92 %. Desafortunadamente en el Perú solo un pequeño porcentaje de agua recibe tratamiento, por tanto una inmensa cantidad de agua contaminada se vierte a nuestro mar, ríos y lagos sin ningún tratamiento previo⁵. En el 2009 la Superintendencia Nacional de Servicios de Saneamiento registró que el volumen de aguas residuales volcado a la red es de 786 379 599 m³ anual, de los cuales solamente el 35 % es tratado; con la entrada en operación de la planta de tratamiento Taboada las aguas residuales tratadas en Lima se incrementó de un 21 a 60 %⁶. Además esta contemplado el tratamiento biológico o secundario como una oportunidad de mejora ambiental en el tratamiento de aguas residuales domésticas⁷.

El problema de los efluentes urbanos e industriales está íntimamente relacionado con la contaminación ambiental, ya que constituye una de sus causas. Con el aumento de la población y las necesidades creadas se fueron multiplicando los problemas que ocasionan los residuos generales, que lógicamente van en aumento con aquélla. Esta es una consecuencia obligada y que fundamentalmente proviene de la falta de previsión al no incluir en las inversiones iniciales una planta de tratamiento de efluentes⁸.

Un tratamiento de aceites de desecho usando microorganismos (lipolíticos) capaces de bioconvertir (o biodegradar) estos en productos de interés reduciendo así su impacto en el ecosistema⁹ sería una alternativa adecuada a este problema. Si se diseña para los microorganismos

biodegradadores la correcta combinación de nutrientes y factores ambientales se permitirá romper las cadenas químicas y desactivar sus propiedades¹⁰.

La biodegradación es el fundamento de un tratamiento biológico que se aplica para desdoblar sustancias químicas indeseables como las grasas, aceites, proteínas u otros sustratos presentes en las aguas residuales. Las bacterias pueden desempeñar un papel importante en el ciclo de la materia orgánica, catalizada por enzimas en entornos domésticos¹¹. Los microorganismos pueden mejorar la transformación de los contaminantes haciendo de ellos efectivos agentes de biodegradación¹².

Por todo lo expuesto, es que se escogió estudiar a un grupo selecto de bacterias, proporcionadas por el departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Los objetivos de la presente tesis son:

- Evidenciar la actividad lipolítica del inóculo de *Pseudomonas aeruginosa* en las muestras de aceites de desecho de locales de expendio de comida rápida.
- Cuantificar la actividad lipolítica del inóculo de *Pseudomonas aeruginosa*.
- Determinar las condiciones óptimas: concentración de sales, pH inicial, y temperatura de la actividad lipolítica de este inóculo.

I. GENERALIDADES

I.1 Efluentes

Se define como efluentes a todas las emisiones al ambiente que producen efectos no deseables en este¹³. La Agencia de Protección ambiental de los Estados Unidos (USEPA) define efluente como aguas residuales tratados o no, que fluyen fuera de una planta de tratamiento, drenaje o desagüe industrial¹⁴. Comunmente se reconoce al efluente como el término que se emplea para nombrar a las aguas servidas con desechos sólidos líquidos o gaseosos que son emitidos por viviendas y/o industrias generalmente a los sistemas de desagües y terminan en los ríos y mares¹⁵. Se pueden clasificar a los efluentes de diferentes maneras. Por su naturaleza y estado; tenemos a los efluentes: sólidos, líquidos, gases, humos, olores y ruidos. Por su origen; tenemos los efluentes domésticos e industriales, estos últimos pueden subdividirse en los diferentes clases de industria (alimentación, metalúrgica, papelera, textiles, de cuero, sanitaria, etc).¹³

Efluentes Grasos: Son todas las emisiones (generalmente líquidas con algunos sólidos disueltos o no) que en su composición tienen una alta carga de aceites y/o grasas (lípidos) que incluyen un gran número de sustancias que están siempre presentes en las aguas residuales domésticas, debido al uso de manteca, grasas y aceites vegetales en cocinas¹⁶. También están incluidos los efluentes provenientes del comercio y expendio de comida rápida (frituras), industria de aceite (palma y pescado), productos lácteos (mantequilla, margarina, helados, yogurt, queso), los mataderos y otros.

Los tipos de grasas y aceites presentes con mayor frecuencia en los sistemas de alcantarillado corresponden a aceites de tipo vegetal y grasas de

tipo animal. Las grasas y aceites son de los compuestos orgánicos más estables y no son fácilmente biodegradables; sin embargo los ácidos minerales las atacan, dando como resultado la formación de ácidos grasos y glicerina¹.

Los residuos grasos generados en el sector alimentario y descargados al medio ambiente, ocasionan impacto ambiental negativo debido a la alta carga orgánica e inorgánica que estos contienen generando en su descomposición, productos altamente tóxicos debido al proceso de peroxidación lipídica. Estos peróxidos causan daño celular en los animales, siendo por ello utilizado en ocasiones como indicador del estrés oxidativo y como biomarcadores de contaminación ambiental¹⁷.

Cuando se descargan efluentes en los cuerpos de agua, los aceites y grasas presentes flotan, constituyéndose en una película sobre el agua que causa daño a la microvida; así también cuando se arrojan grasas y aceites de forma desproporcionada a las redes de alcantarillado estos suelen causar atoro y daño a las tuberías¹⁸.

I.2 Biodegradación de Efluentes

Biodegradación es definida como la reducción de la complejidad de compuestos químicos catalizadas biológicamente. Es el proceso por el cual sustancias orgánicas se descomponen en compuestos más pequeños por acción de los microorganismos^{19,20}. Muchas sustancias grasas presentes en efluentes son casi, sin excepción, biodegradables y por lo tanto estos tipos de efluentes son compatibles con un tratamiento biológico. La Biodegradación puede ser el fundamento de un pretratamiento cuyo objetivo sería producir

agua limpia o efluente tratado que sea reutilizable en el ambiente. Es importante conocer el origen del vertido (industrial, doméstico, comercial, etc.) para valorar la cantidad de contaminantes y su incidencia en el medio. Las aguas residuales pueden contener contaminantes como: grasas, aceites, metales pesados, residuos de materia fecal entre otros²¹.

Para hacer que los biopolímeros solubles e insolubles –principalmente grasas proteínas y carbohidratos- accesibles para la respiración de la bacteria, las macromoléculas deben ser hidrolizadas por exoenzimas, las cuales son frecuentemente producidas y excretadas solo después del contacto con los respectivos inductores. Las exoenzimas adsorben a los biopolímeros y los hidrolizan a monómeros o al menos a oligómeros. Así compuestos solubles de bajo peso molecular (como por ejemplo aminoácidos, oligopéptidos, disacáridos, azúcares, ácidos grasos, glicerol) pueden ser absorbidos por los microorganismos y metabolizados para la producción de energía y la multiplicación celular²⁰.

Para el tratamiento de residuos grasos industriales, se usan técnicas convencionales que implican procesos y adición de productos químicos de alto costo, que generalmente deterioran el medio ambiente, y que al final, generan productos recalcitrantes requiriendo estos últimos un tratamiento más complejo y costoso³. La biodegradación es un proceso natural, ventajosa no solo por permitir la eliminación de compuestos nocivos impidiendo su concentración, sino que además es indispensable para el reciclaje de los elementos en la biosfera, permitiendo la restitución de elementos esenciales en la formación y crecimiento de los organismos (carbohidratos, lípidos y proteínas). La descomposición puede llevarse a cabo en presencia de oxígeno (aeróbica) o

en su ausencia (anaeróbica). La primera es mas completa y libera energía, dióxido de carbono y agua, es la de mayor rendimiento energético. Los procesos anaeróbicos son oxidaciones incompletas y liberan menor energía¹⁵.

I.3 Microorganismos como Biodegradadores

Los microorganismos son los seres mas primitivos y numerosos que existen en la Tierra, colonizan todo ambiente y participan en forma vital en todos los ecosistemas y están en interaccion continua con plantas animales y el hombre. Los microorganismos son clave para el funcionamiento de los sistemas biológicos y el mantenimiento de la vida sobre el planeta, pues participan en procesos metabólicos, ecológicos y biotecnológicos de los cuales dependemos para sobrevivir y enfrentar los retos del futuro. Estos retos son gigantescos para la continuidad de la vida, en particular, para satisfacer la demanda de alimentos y medicamentos y resolver problemas ecológicos y de contaminación ambiental. Los microorganismos participan en procesos ecológicos que permiten el funcionamiento de los ecosistemas, y biotecnológicos que son esenciales para la industria farmacéutica, alimenticia y médica; son los principales responsables de la descomposición de la materia orgánica y del ciclaje de los nutrientes (carbono, nitrógeno, fosforo, azufre, etc.) descomposición y mineralización de desechos orgánicos (materia orgánica)²².

Un gran número de microorganismos son usados actualmente en el tratamiento de residuos de todo tipo (ver tabla N°1); aunque destacan principalmente las especies como *Pseudomonas*, *Bacillus*, etc.

Microorganismos de interés para uso en biodegradación de desechos:	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>MGP-1</i>	Se estudia la capacidad de este microorganismo de degradar n-alcanos de cadena media y larga (11-40 átomos de carbono) ²³
<i>Pseudomonas</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Acinetobacter</i>	Se encontró que estos microorganismos podrían reducir la concentración de aceites y grasas de aguas residuales. ²⁴
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Se estudió la capacidad de degradar grasas y aceites bajo condiciones idóneas. Se propone forme parte de un futuro tratamiento biológico. ²⁵
<i>Pseudomonas</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Enterobacter</i>	Se estudió bacterias endógenas provenientes de un residuo graso industrial la cual degradó 91.4% de las grasas. ¹⁷
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Añadiendo un inóculo de <i>P. aeruginosa</i> como primer paso para la producción de biogás, este incrementa la cantidad de metano (33%) al tercer día en el biodigestor. ²⁶
<i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Arthrobacter sp.</i>	Esos microorganismos fueron seleccionados de un total de 124 por su habilidad para reducir la grasa en los contaminantes. ²⁷
<i>Pseudomonas aeruginosa T1</i>	Esta cepa fue aislada de aguas termales y muestra una enorme capacidad de degradar grasas y aceites. ²⁸
<i>Bacillus pumilus</i> , <i>Brevibacterium</i> , <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	Bacterias autóctonas fueron evaluadas en la biodegradación de aguas residuales las cuales fueron efectivas en la reducción de la carga contaminante. ²⁹
<i>Burkholderia sp.</i>	Este microorganismo fue seleccionado por ser uno de los que presentaba mayor rango de degradación de lípidos en diversas fuentes de aguas residuales. ³⁰
<i>Klebsiella</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Staphylococcus</i>	Fueron investigados 32 tipos de bacterias lipolíticas siendo estos microorganismos los que presentaron mejor actividad siendo su uso promisorio para futuras aplicaciones. ¹¹

Tabla N°1 Microorganismos selectos cuyo uso en el tratamiento de algunos tipos de desechos ofrecen resultados prometedores.

Los microorganismos participan en la regulación de los ciclos biogeoquímicos (nitrógeno, fósforo, azufre, etc.) retención y liberación de nutrientes para las plantas. Generación, mantenimiento y renovación del suelo y su fertilidad. Regulación atmosférica de gases traza (producción y consumo: CO₂, NO₂, N₂, etc.) Regulación de las poblaciones de animales y plantas. Control de plagas agrícolas y urbanas. Síntesis de productos farmacéuticos, alimenticios industriales y de control biológico. Mantenimiento de la productividad primaria de agroecosistemas y ecosistemas. Recuperación de suelo y vegetación de ecosistemas degradados²².

I.4 El Género *Pseudomonas*

El género *Pseudomonas* abarca uno de los más diversos y ecológicamente significativos grupos de bacterias en el planeta; los miembros de este género se encuentran en gran número en todos los principales entornos naturales (terrestres, de agua dulce y marinos). Esta distribución universal sugiere un alto grado de capacidad de adaptación fisiológica y genética³¹. El género *Pseudomonas* pertenece a la familia *Pseudomonadaceae*; que también incluye al género *Xanthomonas*, que se sitúa dentro del orden *Pseudomonadales*; que además comprende la familia *Moraxellaceae*.

I.4.1 Descripción general

Pseudomonas es un género de especies bien conocida por su versatilidad metabólica y plasticidad genética; son capaces de utilizar un amplio

rango de compuestos, ya sea orgánicos como inorgánicos; inclusive toman como sustrato compuestos orgánicos tóxicos como hidrocarburos alifáticos y aromáticos y son capaces de vivir bajo diversas condiciones ambientales. Son frecuentemente resistentes a antibióticos, desinfectantes, detergentes, metales pesados y solventes orgánicos; debido a estas características, estos microorganismos son muy ubicuos, y podemos encontrarlos tanto en los ecosistemas terrestres como acuáticos y son importantes como patógenos de plantas, animales y humanos³².

El género *Pseudomonas* era una compleja colección de un gran número de especies; muchas de las cuales han sido reclasificadas en nuevos géneros y, a pesar del reconocimiento de la heterogeneidad filogenética en las bacterias clasificadas como *Pseudomonas*, se ha iniciado una reevaluación de las características fenotípicas, las actividades metabólicas, su genética, ecología y otras características, con el fin de esclarecer y comprender las complejas relaciones filogenéticas intragénicas^{33,34}.

El desarrollo de métodos de análisis a nivel molecular aplicado a los microorganismos nos ha permitido diferenciar *Pseudomonas* en el sentido estricto de las bacterias fenotípicamente similares y se han utilizado métodos de comparación de secuencias del 16S rRNA o hibridación rRNA-DNA³⁵. De Vos et al. propuso que el género *Pseudomonas* se limite a las especies relacionadas con *P.aeruginosa* en el grupo I de homología DNA-rRNA dentro de la subclase γ y de las Proteobacterias, actualmente reorganizado como la clase de las “Gammaproteobacterias”³⁶.

A las especies que comprenden este grupo se las conoce como las “verdaderas *Pseudomonas*” o las “*pseudomonadales* fluorescentes” debido a

los pigmentos fluorescentes producidos por *P.aeruginosa*, *P.fluorescens* y otras especies del género. Sin embargo, no todas las especies del llamado grupo de “*Pseudomonadales* fluorescentes” producen realmente pigmentos fluorescentes, como por ejemplo *P. alcaligenes*, *P. mendocina*, o *P. stutzeri*³⁷.

I.4.2 Características

Pseudomonas spp. son bacilos gram negativos, aerobios, no esporulados, rectos o curvos (bastoncillos) que pueden aparecer aislados así como también en parejas o en cadenas, no esporulado que puede presentar de 1.5 a 5 µm de largo y un diámetro de 0.5 a 1.0 µm; las especies de este género son móviles, debido a que pueden presentar uno o más flagelos polares y muchas proyecciones en su pared llamadas fimbrias. Debido a esta movilidad estas especies pueden responder a estímulos químicos (quimiotaxis) así como también localizar substratos en bajas concentraciones. Algunas *Pseudomonas* poseen microcápsulas y pigmentos solubles en agua³⁸.

Es oxidasa y catalasa positiva. La mayoría de especies del género, no crecen bajo condiciones ácidas (pH 4.5 o menor). Crecen en agar Mac Conkey, como no fermentadores de lactosa. Poseen un metabolismo aerobio estricto con el oxígeno como aceptor final de electrones, aunque algunos aislados pueden crecer lentamente en condiciones anaerobias utilizando el nitrato (NO₃) o la arginina como aceptores finales de electrones. Puede degradar la glucosa oxidativamente y convertir el nitrógeno en nitrito o nitrógeno gaseoso³⁷.

La mayoría de especies tienen una temperatura óptima de crecimiento entre 30-37 °C, pero pueden sobrevivir y multiplicarse en casi cualquier

ambiente, incluyendo aquellos con elevado contenido de sales, y en un rango de temperaturas comprendido entre 20-42 °C. El crecimiento que tienen a 42 °C con la formación de un velo en medio líquido nos ayuda a poder diferenciarla de otras especies. Tienen la capacidad de producir morfologías coloniales distintivas y pigmentadas. Algunas cepas forman una cápsula polisacáridica que hacen que las colonias sean mucosas (típico, por ejemplo, de aislados procedentes de enfermos de fibrosis quística). El crecimiento confluyente, a menudo, presenta un brillo metálico y olor a fruta. Una característica común de las “*Pseudomonadales* fluorescentes” es la producción de pigmentos fluorescentes bajo la luz ultravioleta de longitud de onda baja (254 nm), sobre todo cuando crecen en un medio con limitación de hierro. La pioverdina, un pigmento fluorescente de color amarillo-verdoso, es considerado el principal tipo de sideróforo de las especies de *Pseudomonas*. Otros pigmentos producidos por especies del género son la piocianina (pigmento no fluorescente de color azul-verdoso producido por la mayoría de cepas de *P.aeruginosa*), piorubina (*P.aeruginosa*, color rojo similar al óxido), oxidoclororafina (*P.aureofaciens*, *P.chlororaphis*, color naranja), y la clororafina (*P.chlororapis*, color verde), entre otros. Muchos pigmentos actúan como sideróforos en los sistemas bacterianos de captación de hierro. La producción de pigmentos puede demostrarse cultivándolos en medios que no contiene hierro como el medio de King B. Este medio está también recomendado para demostrar la producción de piocianina. Las cepas no pigmentadas presentan un color gris pálido. Cuando crecen en agar sangre, normalmente presentan hemólisis. Existe por lo menos un 10% de *Pseudomonas aeruginosa* que son apigmentadas³⁷.

I.4.3 Hábitat

Pseudomonas es un género verdaderamente ubicuo, lo cual parece ser consecuencia de los simples requerimientos nutritivos que posee, del rango de compuestos de carbón que utiliza, y de su gran adaptabilidad genética y metabólica. Cualquier hábitat con un rango de temperatura de 4-42 °C, un pH comprendido entre 4- 8 y que contenga compuestos orgánicos simples o complejos, es un hábitat potencial para *Pseudomonas*, pueden vivir en numerosos hábitats, que van desde diferentes ambientes como los suelos, aguas estancadas hasta tejidos diversos de animales y plantas, incluyendo frutas y verduras por lo tanto el hábitat primario es ambiental aunque algunas especies se encuentran formando parte de la flora intestinal de diferentes animales y del hombre ³⁸.

I.4.4 *Pseudomonas aeruginosa*.

Pseudomonas aeruginosa fue aislada por primera vez de muestras ambientales por Schroeter. Debido a que las colonias de *P. aeruginosa* son pigmentadas, la denominación de la especie deriva de la palabra aeruginoso (aeruginous) que significa “el color del cobre oxidado”, reflejando el característico color azul-verdoso que presentan las colonias debido a la producción de pigmentos.

Como todos los miembros de esta familia, es un bacilo gram negativo aerobio, muy versátil metabólicamente, pudiendo utilizar más de 80 compuestos orgánicos como fuentes de carbono y energía. Es oxidasa positiva y puede crecer a temperaturas superiores a 42°C. Aunque se clasifica como

aerobio estricto, algunas cepas pueden crecer anaeróbicamente mediante desnitrificación³⁹ o mediante la fermentación de compuestos como la arginina o piruvato.

Pseudomonas aeruginosa tiene un genoma grande y gran parte de estos genes están implicados en la regulación proporcionando a la bacteria una enorme diversidad de vías metabólicas y fisiológicas para sobrevivir en ambientes acuosos con nutrientes mínimos⁴⁰. En los últimos años, debido a esa misma habilidad y a que es un reconocido productor de lipasas *P. aeruginosa* ha resultado ser muy útil en la biodegradación de efluentes de aceite de palma⁴¹.

La morfología colonial, pigmentación y propiedades de movilidad de esta especie pueden ser bastante heterogéneas. Aunque la colonia típica es alargada y plana, con el centro elevado, dándole una apariencia como de huevo frito, existen numerosas variantes, sobre todo cuando crecen formando biopelículas después de que estas cepas hayan estado expuestas a estrés medioambiental, por la presencia de antibióticos, o durante infecciones crónicas de las vías respiratorias humanas. Muchas variantes de la morfología colonial presentan también alteraciones fenotípicas respecto a la resistencia a los antibióticos, la movilidad, expresión de genes de virulencia propiedades de adherencia y formación de biopelículas. La generación de estas variantes con propiedades fenotípicas diversas contribuye a la persistencia y éxito como patógeno de *P.aeruginosa*³⁷. Cabe resaltar que en estudios de cepas clínicas y ambientales se conserva el 90 % del genoma y en hábitats con múltiples cepas presentes ninguna parece ser la dominante⁴⁰.

I.4.4.1 La membrana externa de *Pseudomonas aeruginosa*

La membrana externa de las bacterias gram-negativas es una membrana semipermeable, formada principalmente por el lipopolisacárido, que permite la difusión de solutos hidrofílicos pequeños y tiene muy baja permeabilidad para los compuestos hidrofóbicos. *Pseudomonas aeruginosa* presenta una baja permeabilidad en su membrana externa (aproximadamente un 8 % de la *E.coli*), la cual está determinada por las propiedades de las porinas, que son proteínas formadoras de poros de baja especificidad⁴². Esta propiedad surge, probablemente, de la competición por un nicho ecológico, como por ejemplo el suelo, donde muchos microorganismos producen sustancias antibióticas. En *P.aeruginosa* básicamente existen tres tipos de resistencia: intrínseca, adaptativa o inducible y mutacional. Siendo la baja permeabilidad de la membrana el elemento que los tres tipos de resistencia comparten. Esta baja permeabilidad es debida a una serie de porinas con una débil efectividad, que hacen que la membrana presente un marcado límite de exclusión, permitiendo el paso de compuestos de unos 3000 Da de peso molecular, comparado con el límite de 500 Da que presenta *E.coli*. la porina que contribuye en mayor medida a este gran límite de exclusión es la porina mayoritaria OprF, aunque también están implicadas otras porinas como la OprD o incluso, la porina inducida OprB³⁷.

I.4.4.2 Secreción de Proteínas

Practicamente todas las bacterias secretan proteínas al medio extracelular. Se han reportado cuatro vías de secreción de proteínas en bacterias gram-negativas, y tres de ellas están presentes en *P.aeruginosa*⁴².

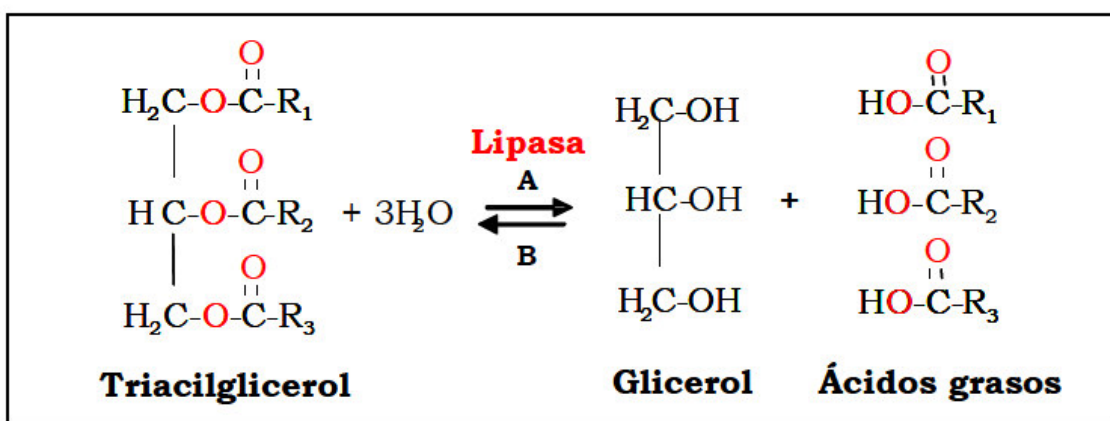
En la secreción tipo I las exoproteínas pasan directamente al medio extracelular sin pasar por el espacio periplásmico. En la translocación por esta vía no participa el péptido señal, sino depende de la presencia de ciertas firmas de aminoácidos en la región carboxilo de las proteínas, así como del concurso de algunas proteínas accesorias específicas para la translocación del polipeptido a secretar. En *P.aeruginosa* la proteasa alcalina codificada por el gene aprA se secreta por esta vía; participan en su secreción las proteínas AprD, AprE, y AprF. Las lipasas de *Pseudomonas fluorescens* son secretadas por este tipo de vía⁴³.

La vía de secreción tipo II, también llamada vía de secreción general, es la responsable de la secreción de la mayoría de las proteínas extracelulares en bacterias gram-negativas, aunque *E.coli* y *Salmonella* no la presentan. En esta ruta, la secreción a través de la membrana interna depende del sistema Sec, presente en bacterias gram-positivas y gram-negativas, y del péptido señal en el extremo amino de las proteínas que se translocan. Una vez en el espacio periplásmico, las proteínas se translocan por un conjunto de 12 a 14 proteínas, que en *P.aeruginosa* se denominan Xcp. Las proteínas que se transportan por el sistema Xcp en *P.aeruginosa* son, entre otras, la elastasa, la lipasa⁴⁴, la exotoxina A, las fosfolipasas y la fosfatasa alcalina.⁴²

El sistema de secreción tipo III transloca las proteínas directamente de la bacteria a la célula eucariote, por lo que se encuentra presente en bacterias patógenas de animales o plantas o en sus simbiotes como las bacterias del género *rhizobium*. En *P.aeruginosa* varias exotoxinas se translocan a las células eucariontes mediante este sistema tipo III⁴².

I.5 Lipasas

La Comisión de Enzimas de la IUPAC define a las lipasas como triacil éster hidrolasas (EC 3.1.1.3)⁴⁵ es decir que son un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis reversible (ver Fig 1) de triacilglicéridos de grasas animales y de aceites vegetales para originar ácidos grasos de cadena larga (\geq C10) y glicerol.



En la Fig 1 se muestra la acción catalítica de las lipasas. Un triglicérido puede ser hidrolizado hasta glicerol y ácidos grasos (A) o la reacción reversa (B) que combina glicerol y ácidos grasos para formar el triacilglicérido⁴⁶.

Esta hidrólisis tiene lugar a través de los pasos intermedios de formación de diacilglicéridos y monoacilglicéridos. Las lipasas constituyen un tipo especial de esterasas que actúan de forma específica sobre ésteres insolubles en agua en la interfase lipídico-acuosa.

Las esterasas en cambio hidrolizan ésteres en los que participan ácidos grasos de cadena corta (\leq C10) cuya hidrólisis se realiza en sustratos que son solubles en agua.

El enorme potencial biotecnológico reside en sus principales características:

- Su estabilidad frente a los disolventes orgánicos.⁴⁷
- La amplia especificidad que poseen ante un sustrato porque catalizan tanto acilación como deacilación de grasas.
- Son altamente enantioselectivas y regioselectivas.³⁷

Las lipasas se encuentran ampliamente distribuidas por la naturaleza y han sido aisladas en microorganismos, plantas y animales. La base de datos Ingeniería de Lipasa⁴⁸ contiene 1367 secuencias de lipasas microbianas y serin-hdrolasas agrupadas en 16 superfamilias. Las lipasas microbianas han recibido una atención especial debido a sus aplicaciones industriales, médicas⁴⁹ y a su gran accesibilidad encontrándolas en bacterias, levaduras y hongos siendo la mayoría lipasas exocelulares, es decir atraviesan la membrana celular una vez sintetizadas y pasan al medio externo. En general son glicoproteínas (aunque algunas pueden ser lipoproteínas)⁵⁰ que contienen entre 3 y 15 % de glúcidos en su estructura, preferentemente manosa y es frecuente que un mismo microorganismo produzca varias isoenzimas las cuales actúan en algunas ocasiones sobre diferentes sustratos presentando mayormente diferencias en sus parámetros cinéticos y condiciones óptimas de reacción.

La mayoría de las lipasas microbianas presentan su actividad máxima a intervalos amplios de pH que van de 5,6 a 8,5, y son más estables a pH neutro, por otro lado son activas en intervalos amplios de temperatura, que varían de 20 a 45 °C, si bien el intervalo óptimo es de 30 a 45 °C, por encima de los 40 °C muchas lipasas microbianas pierden rápidamente su actividad con excepción de las producidas por *Aspergillus niger*, *Rhizopus japonicus*,

Chromobacterium viscosum y *Geotrichum candidum* que son estables a temperaturas superiores a 50 °C⁴⁵.

I.5.1 Estructura y mecanismo de acción de las Lipasas

Existe un gran número de lipasas conocidas que muestran un amplio rango de peso molecular que van desde 19 KDa hasta 60 KDa (lipasa *Cándida rugosa*) y además tienen características estructurales comunes a pesar de presentar diferencias en cuanto al tamaño, origen y secuencia de aminoácidos.

Todas las lipasas con excepción de la lipasa pancreática están formadas por un dominio único y presentan conformaciones del tipo α/β hidrolasa (fig.2) que constituyen una lámina β central hidrofóbica, conformada por diferentes cadenas β ($\beta 1$ - $\beta 8$) conectadas por hasta 6 α hélices anfipáticas. Secuencias peptídicas α -hidrolasas flanquean la lámina β central por ambas caras.

La maquinaria catalítica de éstas enzimas está conformada por una triada de aminoácidos constituida por serina, aspártico (o glutámico) e histidina (Ser-Asp/Glu-His). Esta triada catalítica está presente en prácticamente la totalidad de lipasas.⁴⁸

La acción catalítica de las lipasas se divide en dos etapas:

1) Activación interfacial: en solución acuosa, un segmento helicoidal de la cadena proteica denominado “tapadera” cubre el centro activo de la lipasa. En las lipasas pequeñas como la de *Mucor miehei* una única α -hélice forma la tapadera mientras que en las lipasas de gran tamaño como la de *C. rugosa* está formada por dos α -hélices⁵²

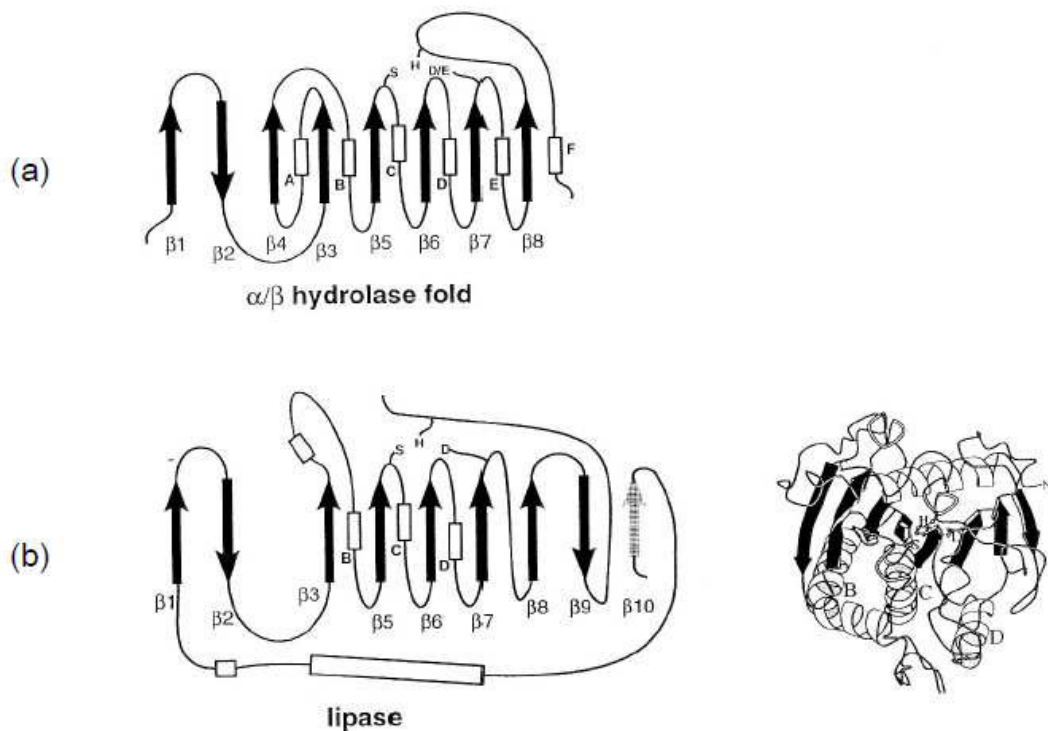


Figura 2 (a) Representación esquemática de la conformación canónica α/β que presentan todas las lipasas de estructura tridimensional conocida; (b) Representación esquemática y tridimensional de la estructura de la lipasa de *Humicola lanuginosa*. Cada uno de los filamentos de la lámina β se designa por un número mientras que los tramos correspondientes a hélices α se nombran con una letra. Las letras S, H y D/E indican la localización de los residuos catalíticos: S: Serina; H: Histidina; D/E: Ácido Aspártico/Glutámico ⁵¹

En presencia de una interfase o en un medio orgánico la tapadera se abre, lo que se ha comprobado mediante el análisis del complejo inhibidor-lipasa de *Mucor miehei*. La apertura de la tapadera provoca un cambio total en la superficie de la entrada al centro activo, de manera que se vuelve más hidrofóbica y se favorece la interacción de la enzima con el sustrato⁵³.

2) Hidrólisis del enlace éster del sustrato: la hidrólisis sucede mediante un mecanismo similar al de las serín-proteasas con los siguientes pasos:

a. El sustrato se sitúa en el centro activo de la lipasa de tal manera que el carbono carbonílico toma contacto con el grupo $-\text{OH}$ de la serina. El protón del grupo hidroxilo de la serina se transfiere al N, de la histidina de la triada

catalítica y el O_Y con carga negativa ataca nucleofílicamente al grupo carbonilo del sustrato con lo que se produce un intermedio tetraédrico (T_d1)⁵⁴. La función del ácido glutámico/aspártico, presente en la triada catalítica, es la estabilización de la carga positiva generada sobre la histidina en los intermedios tetraédricos.

b. La carga negativa, en un principio situada en el O_Y de la serina, sufre una translocación hacia el oxígeno del grupo carbonilo, originando un oxianión. Este oxianión encaja en un hueco que se forma tras la apertura de la tapadera⁵⁴.

c. El intermedio tetraédrico se rompe cuando el protón cedido a la histidina se transfiere al oxígeno del alcohol. El alcohol se libera y luego se forma el complejo acil-enzima⁵⁴.

d. Se produce un segundo ataque nucleofílico, esta vez de una molécula de agua sobre el carbono carbonílico del complejo acil-enzima. Se forma un nuevo intermedio tetraédrico (T_d2) que, a continuación se rompe, liberando un ácido graso y regenerando el $-OH$ de la serina⁵⁴.

I.5.2 Producción de lipasas

Las lipasas de origen microbiano usadas en biotecnología son en general enzimas extracelulares que suelen aparecer en el medio de cultivo al final de la fase de crecimiento exponencial de la biomasa. Se sabe que es necesaria la presencia de una sustancia lipóide (triglicérido, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, detergentes tipo tween) sólo o en presencia de otras fuentes de carbono. No obstante el papel del inductor no está claro. Se ha

puesto de manifiesto que el empleo de diferentes inductores como única fuente de carbono, y en diferentes porcentajes induce la producción de diferentes lipasas crudas con diferentes actividades y/o enantioselectividad⁵⁵.

Estudios genéticos han identificado siete genes que expresan diferentes lipasas. Este hecho abrió las puertas a pensar que las diferentes isoenzimas descritos no se debían a modificaciones postransduccionales, sino a la expresión de diferentes genes, la cual podía ser modulada por las condiciones de fermentación⁵⁶. En esta línea Lotti, y col.⁵⁷ han demostrado recientemente que la regulación de estos genes puede hacerse en función de la fuente de carbono utilizada. Así, el empleo de glucosa como única fuente de carbono provoca la expresión de los genes de lipasa constitutiva, la cual se excreta muy lentamente y en pequeña proporción, al medio de reacción, inhibiendo la expresión de los genes adaptativos. Por el contrario, el ácido oleico permite la expresión de los genes adaptativos inhibiendo la de los genes constitutivos. En este caso se observa gran aparición de actividad lipásica en el medio de cultivo, ya que las lipasas adaptativas parecen excretarse al medio con una gran facilidad. En este caso se ve una fuerte secreción de lipasas al principio, seguida de una acumulación intracelular de lipasa. Esto indica que el paso limitante del proceso es el transporte a través de la pared celular. Durante los ensayos de crecimiento celular en batch, empleando ácido oleico como fuente de carbono, el transporte de la lipasa hacia el exterior es más lento que la biosíntesis de la lipasa produciéndose una acumulación intracelular de la enzima. Por el contrario, en el caso de emplear glucosa como fuente de carbono, se produce una lenta expresión de la lipasa que se excreta al medio por un proceso algo más rápido con lo que no queda lipasa intracelular; para

confirmar este punto se han realizado experimentos de fermentación en continuo para mantener las células de cultivo en un estado metabólico estable y ácido oleico 2 g/l como inductor. Estos estudios han demostrado que bajas velocidades de crecimiento celular (μ baja) hacen que casi toda la lipasa sintetizada sea excretada al medio. Por el contrario, altas velocidades de crecimiento (μ alta) hacen que la lipasa se acumule mayormente en el interior celular.⁵⁸

I.5.3 Homologías estructurales entre lipasas. Especificidad de sustrato

Dentro de su estructura, todas las lipasas tienen en común un núcleo de láminas β paralelas rodeadas por α hélices. Además poseen una triada catalítica cuyo orden en la secuencia aminoacídica es similar. Se cree que todas estas enzimas proceden de un mismo gen y que posteriormente han sufrido una evolución diferente con el tiempo. A pesar de esta similitud estructural y de la presencia de un mecanismo catalítico parecido, las lipasas presentan una especificidad de sustrato bien diferente entre ellas. Este comportamiento se debe a las variaciones estructurales en la región próxima al centro activo⁵².

Los triglicéridos suelen ser moléculas grandes que deben encajar en la cavidad del centro activo para que puedan ser hidrolizados correctamente. En el caso de la lipasa B de *Candida antarctica*, el centro activo se encuentra al final de un profundo y estrecho túnel que solo es capaz de admitir triglicéridos de pequeño tamaño. En cambio, en la lipasa de *Candida rugosa*, el túnel que

está en las inmediaciones del centro activo, es capaz de albergar una cadena de, al menos, doce átomos de carbono⁵³.

I.5.4 Reacciones catalizadas por enzimas lipolíticas y aplicaciones

Las reacciones y aplicaciones más importantes de las lipasas de origen microbiano son:

a) Reacciones de hidrólisis: Donde las lipasas intervienen en procesos de hidrólisis de aceites vegetales en la industria oleoquímica, producción de aromas y sabores para la industria alimentaria, inclusion de detergentes para la eliminación de la estructura de triglicéridos y resolución de mezclas quirales⁵⁹.

b) Reacciones de síntesis: Síntesis de triglicéridos, síntesis de precursores de péptidos, producción de esteroides para la industria farmacéutica, resolución de mezclas racémicas de alcoholes en la industria farmacéutica, síntesis de alcoholes terpénicos como saborizantes y síntesis de aceites glucídicos para la industria cosmética⁵⁹.

c) Reacciones de interesterificación: Variación de la composición de ácidos grasos en mezclas de triglicéridos y eliminación de ácidos grasos responsables de causar la inestabilidad en el sabor de ciertos aceites y mantequillas⁵⁹.

d) Reacciones de transesterificación: Preparación de compuestos enantioméricamente puros y transesterificaciones enantioselectivas dobles⁵⁹.

Actualmente el estudio de las lipasas se encamina a una serie de aplicaciones en el cuidado del medio ambiente y la reducción de la carga contaminante en procesos de tratamiento de residuos ya que las normativas de

legislación tienden a ser más exigentes demandando procesos más limpios y menos contaminantes, esto está provocando un gran esfuerzo de investigación en el campo de las enzimas hidrolíticas en especial de las lipasas. Algunos de los trabajos en los que se está haciendo hincapié son:

La contaminación de suelo y aguas por químicos industriales e hidrocarburos del petróleo; es un serio problema del mundo moderno; debido a su uso intensivo estos se encuentran contaminando numerosos ambientes acuáticos y terrestres. La actividad de las enzimas extracelulares es el paso clave en la degradación y utilización de polímeros orgánicos. Las enzimas hidrolíticas irrumpen los principales enlaces químicos en las moléculas tóxicas resultando en la reducción de su toxicidad. La actividad de lipasas fue la responsable de la drástica reducción del total de hidrocarburos de suelos contaminados⁶⁰.

La implementación de procesos enzimáticos (donde intervienen enzimas hidrolíticas como las Lipasas) en lugar de los procesos convencionales reducen la magnitud de la contaminación ambiental, debido a que estas son específicas y de rápida acción además frecuentemente ahorran materias primas, energía y agua en comparación a los procesos convencionales⁶¹.

Las grasas en las plantas de tratamiento de aguas residuales que contienen principalmente triglicéridos se hidrolizan por el uso de lipasas inmovilizadas^{62,63} también el uso de estas con otros métodos en combinación están dando muy buenos resultados⁶⁴. Las lipasas pueden ser usadas para acelerar la degradación de ácidos grasos residuales⁶⁵. El uso de lipasas en el tratamiento de residuos de aceite en el proceso de refinado y envasado está en ascenso debido a resultados prometedores⁶⁶. La aplicación de un pre-

tratamiento para hidrolizar lípidos puede mejorar la degradación biológica de los efluentes grasos acelerando los procesos y reduciendo el tiempo es así que las lipasas pueden aplicarse en el tratamiento de efluentes de diferentes orígenes⁶⁷⁻⁶⁹

I.6 Marco Legal y Normativo

En el Perú los efluentes domésticos e industriales (donde se encuentran incluidos los efluentes grasos) se encuentran regulados por el sector Saneamiento y estos son normados por el sector público (El Estado y sus organismos autónomos). El Estado Peruano promueve la participación del sector privado mediante concesión a nivel nacional, enmarcado en la ley General de Servicios de Saneamiento Ley N°26338 y su reglamento⁷⁰.

El abastecimiento del agua, alcantarillado, disposición de excretas, reuso de aguas servidas y disposición de residuos sólidos quedan sujetos a las disposiciones que dicta la autoridad de salud competente, la que vigilará su cumplimiento (Ley General de Salud N°26342)⁷¹. El estado también promueve el tratamiento de las aguas residuales (que incluyen los efluentes grasos) con fines de reutilización considerando como premisa la obtención de la calidad necesaria de reuso, sin afectar la salud humana, el ambiente o las actividades en las que se reutilizan (Ley General del ambiente N°28611)⁷².

En el Decreto Supremo N°021-2009 Vivienda definen los Valores máximos admisibles (VMA) de descargas al sistema de alcantarillado sanitario a fin de evitar el deterioro de las instalaciones, infraestructura sanitaria, maquinarias, equipos y asegurar su adecuado funcionamiento, garantizando la sostenibilidad

de los sistemas de alcantarillado y tratamiento de aguas residuales. Son aplicables en el ámbito nacional y son de obligatorio cumplimiento exigible por las entidades prestadoras de servicios de saneamiento⁷³ (SEDAPAL).

Los Aceites y Grasas (A y G) son uno de los parámetros obligatorios de medir para la evaluación de valores máximos admisibles cuyo límite es el de 100 mg/L es decir por encima de ese rango la entidad prestadora de servicios de saneamiento (Sedapal en Lima es la empresa encargada de llevar a cabo esta tarea) se encuentra facultada en virtud del Decreto Supremo N°0214-2009 Vivienda a imponer el cobro de tarifas aprobadas por la autoridad correspondiente (SUNASS) e incluso disponer la suspensión del servicio de descargas al sistema de alcantarillado conforme a la regulación prevista en el reglamento que deriven de la vulneración de los Valores Máximos Admisibles.

Se tiene un marco legal que contempla a los aceites y grasas como uno de los parámetros a considerar en los efluentes producidos e incluso sugieren como alternativa de control medios físicos de separación como las trampas de grasas a fin de prevenir consecuencias graves de contaminación y tratamiento. También se reconoce la capacidad disminuida de control y sanción que tienen las instituciones encargadas de ejercer estas labores^{5,74} y se proponen planes para suplir esta deficiencia así como medidas complementarias que aseguren la aplicabilidad de las normas⁷⁴.

En el Perú las normas que rigen las descargas de efluentes son de carácter transectoriales y sectoriales donde intervienen diversas instituciones que tienen competencias exclusivas y compartidas, lo que en la práctica complica la fiscalización y sanción en caso no se cumplan dichas normas, lo que resulta en un incumplimiento general por parte de los entes generadores de estos

efluentes salvo aquellos que tienen como exigencia en la calidad de sus procesos para certificarse⁷⁵ (grandes empresas exportadoras). Existe interés por parte de algunas entidades estatales como Sedapal y el organismo de evaluación y fiscalización ambiental en lograr el cumplimiento de las normas pero las competencias compartidas, aplicación de sanciones y vacíos legales reduce el alcance y el cumplimiento de sus metas.

II. PARTE EXPERIMENTAL

II.1 Materiales y Equipos

Materiales

- Pipetas de 10mL, 5mL, 1mL
- Matraz Erlenmeyer 250mL Pyrex
- Beakers 100mL, 50mL Pyrex
- Placas Petri
- Tubos de Prueba 20mL, 10mL Pyrex
- Probetas 50mL
- Frasco Pyrex 250mL
- Viales

Equipos

- Autoclave
- Balanza Electronica
- Centrifuga
- Estufa Memmert
- Incubadora
- Refrigeradora

Medios de Cultivo

- Agua Peptonada Merck

- Caldo Tripticasa de soya (TSB: Tryptic Soy Broth) Merck
- Agar Cetrimide Merck

II.2 Material Biológico

- *Pseudomonas aeruginosa* cepas clínicas.

II.3 Pre Selección de Cepas

Con la finalidad de identificar las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* con actividad lipolítica, se realizó un estudio preliminar que consistió en reavivar las cepas clínicas luego se repicó en agar cetrimide para detectar cualitativamente la actividad lipolítica y después de seleccionar la cepa, se preparó el inóculo para su evaluación.

Se procedió a reavivar las muestras de *Pseudomonas aeruginosa* proporcionadas en viales con agar inclinado agregando agua peptonada (1.5mL aprox) y se incubó a 37 °C por 24 horas.

Siembra en agar Cetrimide

Se tomó una asada de cada frasco y se procedió con la siembra en agar cetrimide luego se incubó a 37°C por 48-72 horas.

Detección de actividad lipolítica

Se realizó mediante la siembra en agar con tween 80, la aparición de un halo alrededor de las colonias nos indica presencia de actividad lipolítica por

acción de las lipasas⁷⁶. Las cepas seleccionadas fueron aquellas colonias que presentaron los mayores halos en los menores tiempos.

Siembra en caldo TSB

Para la preparación del inóculo se toma una asada de la cepa seleccionada y se sembraron en caldo nutritivo luego se incubó a 37°C por 24 horas. Después se procede a evaluar la actividad lipolítica con los diferentes parámetros ya establecidos.

II.4 Preparación de la muestra

II.4.1 Recolección de las muestras

Las muestras de aceite fueron recolectadas en establecimientos de expendio de comida rápida (principalmente frituras) ubicadas en el Cercado de Lima. Se recolectaron en total cuatro muestras de aprox 200 mL cada una. Dichas muestras fueron colocadas en frascos estériles de 500 mL cerradas herméticamente con tapas rosca de plástico.

II.4.2 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

El material recolectado fue acondicionado en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Se usaron cantidades solicitadas en la técnica operatoria (mL) dependiendo de la concentración dispuesta a evaluar.

Una vez recolectada la muestra se procedió con la técnica agregando las sales en las cantidades indicadas de acuerdo a la proporción a evaluar.

- Se tomaron 6mL de la muestra recolectada y se agregaron 12mL del medio de sales y minerales (A o B) luego inoculamos 2mL de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa*

- Se tomaron 6mL de la muestra recolectada y se agregaron 13mL del medio de sales y minerales (A o B) luego inoculamos 1mL de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa*.

Diagrama de flujo del trabajo de investigación

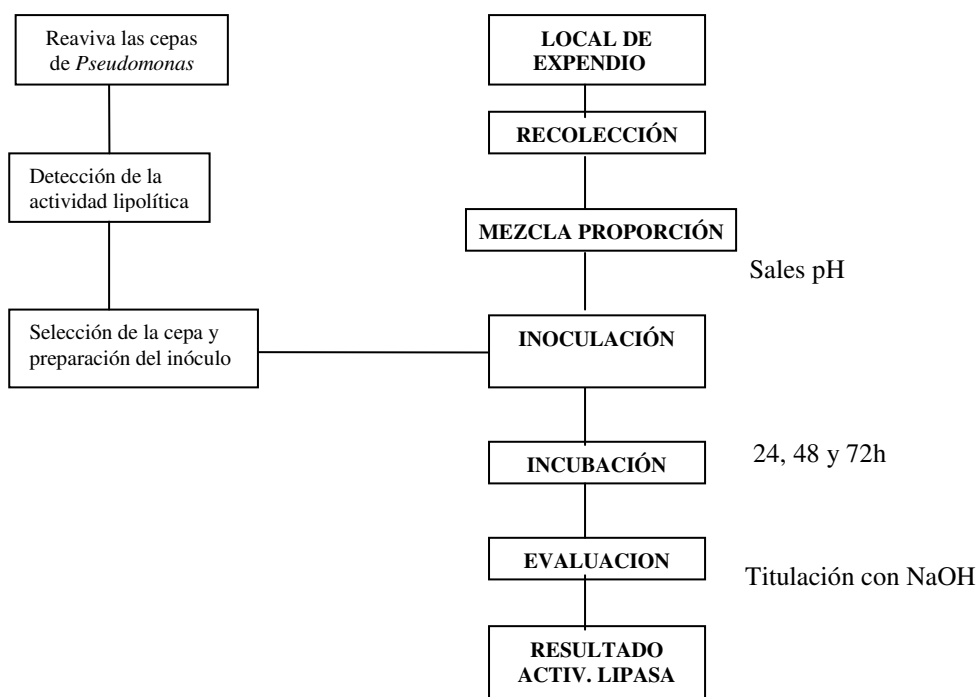


Fig.3. Flujograma del trabajo de investigación

II.5 Evaluación de la actividad lipolítica del inóculo

Se trabajó con la técnica descrita por Sharma et al⁷⁷ y Tembhurkar et al⁷⁸ con algunas modificaciones adaptándolas al presente trabajo.

II.5.1 Método de titulación (Cuantificación)

Fundamento: Esta prueba se basa en medir la cantidad de ácidos grasos liberados por acción de las lipasas por titulación con NaOH en presencia de fenolftaleína.

Se define una unidad de lipasa como la cantidad de lipasa requerida para liberar una μM de ácido graso por unidad de tiempo (una hora) bajo las condiciones de ensayo.

$[\text{NaOH requeridos para titular los ácidos grasos liberados}] = [\text{NaOH requeridos para titular la muestra}] - [\text{NaOH requeridos para titular el blanco}]$.

Entonces en nuestra titulación tenemos la siguiente ecuación:

$$N_1 V_1 = N_2 V_2$$

Donde:

N_1 = Normalidad de los ácidos grasos liberados en la solución (Una unidad de normalidad = $10^3 \mu\text{M}$)

V_1 = Volumen de reacción de la mezcla.

N_2 = Normalidad de la solución de NaOH (0,05 N)

V_2 = Volumen de NaOH requerido para la titulación. Como punto final de la reacción se toma el viraje de color a rosado por más de 30 segundos.

Por medio del presente cálculo obtenemos la cantidad de ácidos grasos liberados ahora procedemos a calcular la actividad de lipasas por unidad de tiempo.

Unidad de enzima ($\mu\text{M/h}$) = Ácidos grasos liberados (μM) / tiempo de incubación (hr)

II.5.2 Método de detección en agar

Fundamento: Esta prueba se basa en la detección de la actividad de las lipasas con la formación de halos que indican la liberación de los ácidos grasos del tween 80 en el agar⁷⁶.

II.6 Evaluación de parámetros y su influencia en la actividad Lipolítica⁵²

Para la evaluación de la actividad lipolítica del inóculo se tomó como criterio los factores físicos que influyen en el crecimiento y metabolismo del microorganismo debido a que estos aumentan, disminuyen e incluso pueden detener dicha actividad; así también se consideró la presencia de inductores en el medio.

II.6.1 Temperatura

Pseudomonas aeruginosa crece dentro de un rango amplio de temperatura (20-45 °C). Se elige entonces temperatura ambiente (20°C), 33 y 37 °C.

II.6.2 pH

Siendo *Pseudomonas aeruginosa* un microorganismo ubicuo es de esperarse que pueda desarrollarse en un rango amplio de pH (4,5-9). Se considera evaluar iniciando con las medidas de 6,7 y 8 respectivamente.

II.6.3 Concentración de sales

En las referencias se encuentra similitudes en la composición de las sales^{24,78-80} pero varían en la concentración de cada una de ellas es así que se toma como modelos a evaluar las siguientes:

Concentración A: KH_2PO_4 0,2 %; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,001 %; NH_4NO_3 0,5 %; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0,8 % y $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01 %. Frecuentemente el calcio actúa como co-factor estimulando la actividad catalítica⁷⁹.

Concentración B: KH_2PO_4 3,2 %; FeSO_4 4uG %; MgSO_4 40uG %; Na_2HPO_4 7,3 % Glucosa 1,0 %; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1 %.⁸¹ Se ha reportado que concentraciones de glucosa mayores a 5% inhiben el crecimiento y producción de enzimas lipolíticas⁸².

II.6.4 Tiempo

Se considera un tiempo de evaluación de 24, 48 y 72 horas. Luego se procede a Titular con NaOH usando fenolftaleína como indicador

II.6.5 Cantidad (proporción) de inóculo empleado

Se considera para la evaluación los porcentajes de 5 y 10 % del volumen total (con una concentración inicial de 1×10^6 ufc/ml).

III. RESULTADOS

III.1 Detección de actividad Lipolítica

A continuación se muestran los resultados obtenidos de las diferentes cepas clínicas proporcionadas

cepa N°	24h
1	++
2	+
3	+
4	+++
5	±

— : No se evidencia formación de halo

± : Halo alrededor del hoyo

+: Tamaño aproximado de halo 10mm

++ : Tamaño aproximado de halo 15mm

+++ : Tamaño aproximado de halo 20mm

III.2 Temperatura

Los mejores resultados se muestran a continuación para un tiempo de 24 horas y un pH de 7; con las distintas concentraciones de sales (A y B).

Tabla 1: Actividad Lipolítica en función de la temperatura (A)

5%	10%	Temperatura °C
0,396	0,417	20
0,750	0,771	33
0,781	0,823	37

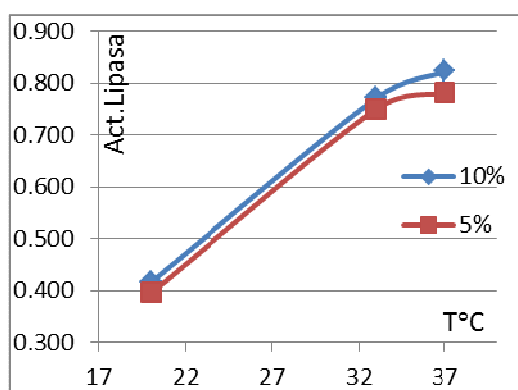


Fig.4: Representacion de la Tabla 1

Tabla 2: Actividad Lipolítica en funcion de la temperatura (B)

5%	10%	Temperatura °C
0,313	0,323	20
0,698	0,656	33
0,740	0,677	37

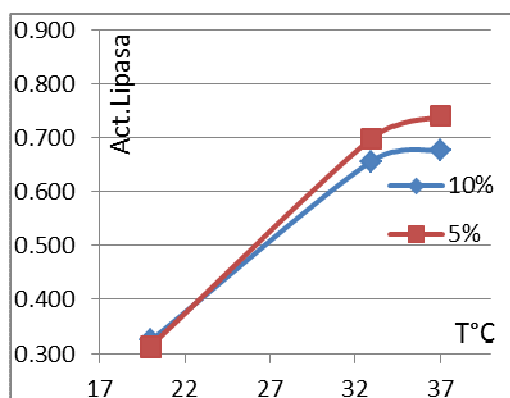


Fig.5: Representacion de la Tabla 2

III.3 pH

Para la evaluación se considera los pH de inicio de 6, 7 y 8. Para llegar al pH inicial se adiciona NaOH.

Los mejores resultados se muestran a continuación para un tiempo de 24 horas y una temperatura de 37 °C; con las distintas concentraciones de sales (A y B).

Tabla 3: Actividad Lipolítica en funcion del pH (A)

5%	10%	pH
0,490	0,510	6
0,781	0,823	7
0,760	0,781	8

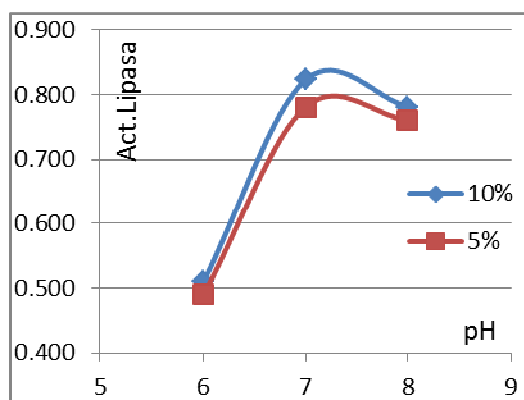


Fig.6: Representacion de la Tabla 3

Tabla 4: Actividad Lipolítica en funcion del pH (B)

5%	10%	pH
0,406	0,448	6
0,740	0,677	7
0,667	0,635	8

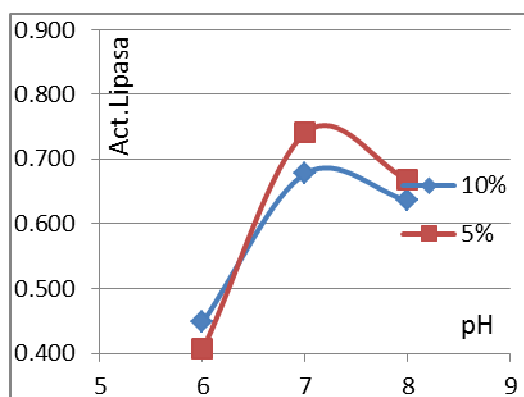


Fig.7: Representacion de la Tabla 4

III.4 Periodo de Incubación

Se considera para la evaluación tres periodos de 24, 48 y 72 horas. Los mejores resultados se muestran a continuación para un pH 7 y una temperatura de 37 °C; con las distintas concentraciones de sales (A y B).

Tabla 5: Actividad Lipolítica en función del Tiempo (A)

5%	10%	Horas
0,785	0,823	24
0,385	0,385	48
0,222	0,222	72

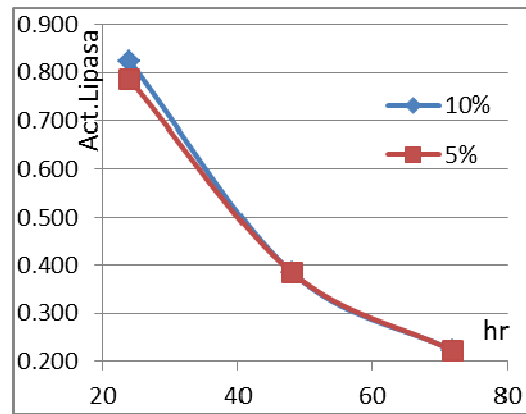


Fig.8: Representacion de la Tabla 5

Tabla 6: Actividad Lipolítica en función del Tiempo (B)

5%	10%	Horas
0,740	0,677	24
0,365	0,354	48
0,208	0,212	72

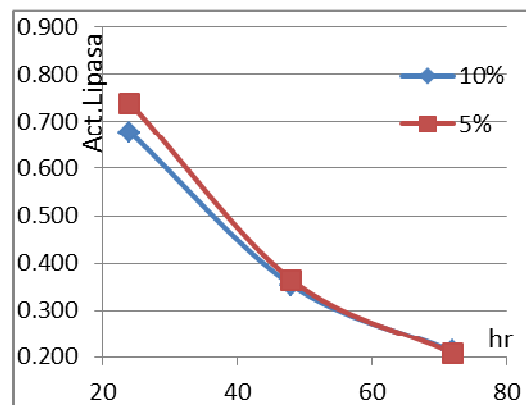


Fig.8: Representacion de la Tabla 6

IV. DISCUSIÓN

Las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* investigadas fueron recolectadas en centros hospitalarios siendo este microorganismo muy estudiado por ser un patógeno oportunista intrahospitalario; en las últimas décadas también se viene investigando las propiedades que tienen estos microorganismos en el tratamiento de residuos líquidos en especial aquellos con alto contenido de lípidos. Los resultados al evaluar el parámetro temperatura nos muestran una mejor actividad lipolítica con una temperatura de 37 °C en comparación con las temperaturas de 33 y 20 °C (Temp. Ambiente) con las cuales se muestran actividades decrecientes respectivamente. Se sabe que a menor temperatura el metabolismo de los microorganismos en general decrece al igual que aumentan significativamente con el incremento de esta. Sin embargo debemos tener en cuenta que mientras los microorganismo se encuentran en fase de crecimiento (también llamada fase logarítmica) donde el número de microorganismos se multiplica exponencialmente, se produce un gran consumo de nutrientes en un medio donde la única fuente de carbono son lípidos, estos microorganismos tienden a producir lipasas para poder aprovecharlos; es así que algunos investigadores llaman inductores al conjunto de compuestos de constitución oleosa.^{11,80,83} Al caracterizar una lipasa de *Pseudomonas sp* aislada de efluentes de plantas de refinación de aceite y procesamiento de conservas de pescado se encontró que la temperatura a la cual mostró una máxima estabilidad y actividad fue de 37 °C aunque también mostró actividad a 50 y 70 °C⁸³. En la degradación de aceite Bin BH.⁸⁴ observó que los valores mas altos se dieron con una temperatura aproximada de 30 °C y una concentración baja de aceite.

Los resultados para evaluar el parámetro pH nos muestran como mejores resultados los pH 7 y 8 muy atrás tenemos el pH 6 esto concuerda con reportes (Huant y col.) quienes encontraron una actividad óptima a pH 7-9 para *Pseudomonas sp.* Resultado similar pH 7 y 37 °C se encuentra para una cepa de *Pseudomonas* aislada de aguas residuales de una planta de refinación de aceite de palma⁸². K Sharma y col.⁷⁷ midieron la influencia del pH en la actividad de lipasas de 12 cepas bacterianas aisladas de muestras de alimentos encontrando los mejores resultados (83 %) en el rango de pH 6-8.

Con respecto al periodo de incubación los mejores resultados se muestran para el periodo de 24 horas teniendo una leve mejora después de 48 h para decrecer luego de 72 h esto puede deberse al uso de los ácidos grasos libres por parte de *Pseudomonas* para aprovecharlos como nutrientes. Caracterizando una nueva bacteria lipolítica Hasanuzzaman y col.²⁸ identificaron una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* que tiene alta capacidad de utilizar los ácidos grasos. Orapin B. y col.⁸³ obtuvieron sus máximos valores de actividad después de 25 h de incubación comenzando a detectar actividad de enzima a las cuatro horas de incubada la muestra. En cambio Peña F⁸⁵ encuentra actividad dentro de las 24-48 h de cultivo.

En la concentración de sales; existen reportes que sugieren que la presencia del ion calcio repercute positivamente en la actividad de las lipasas^{79,86,87} debido a que este se usa en las uniones sobre la posición específica del sitio activo⁴³ los resultados muestran una leve mejora en la actividad lipásica entre la concentración A y la concentración B; además también se ha reportado que si tenemos lípidos y grasas como única fuente de carbono mejora significativamente la producción de las lipasas por lo tanto

esperaríamos que la actividad de esta enzima mejore; en nuestro experimento no se observa dichos resultados. Sin embargo Mongkolthanaruk y col.⁸⁸ lograron mejorar el rendimiento de su inóculo bacteriano reduciendo así el tiempo de tratamiento hasta en la mitad con solo incrementar la composición de algunas sales minerales en una mezcla a la que llamó solución basal de sales.

La determinación de la cantidad de inóculo es un factor importante para lograr una máxima producción y actividad de enzima. En relación a la concentración o cantidad de inóculo que se emplea tenemos como resultado similares actividad de enzima en las primeras 24 horas luego con la concentración de 10 % la actividad decrece en las 48 horas en comparación al primer resultado; esto puede ser debido al rápido consumo de los nutrientes lo que acelera la llegada de la fase de muerte y por consiguiente la disminución de la actividad enzimática; entonces se utilizaríamos la menor concentración ya que aún dupliquemos la cantidad de inóculo los resultados no serían los ideales. K Sharma y col.⁷⁷ encontraron que los mejores resultados para la totalidad de sus aislados se dieron con una cantidad de inóculo que oscila en un rango de 4-8 % (v/v). Además altas cantidades de inóculo puede causar el agotamiento de la totalidad del oxígeno disuelto. En la biodegradación de efluentes de una procesadora de aceite de palma O. Bhumibhamon y col.⁸⁹ usaron un inóculo de 5 % y hallaron como microorganismos más adecuados a las cepas *Acinetobacter sp* (KUL8), *Bacillus sp* (KUL39) y *Pseudomonas sp* (KLB1). Orapin B. et al²⁴ estudiaron el uso de microorganismos productores de lipasa (*Pseudomonas sp.* *Acinetobacter sp* y *Bacillus sp.*) para tratar residuos grasos de cocina y encontraron resultados similares con tamaño de inóculos de 1, 2,5 y 5% sin embargo mejoraron la eficiencia de los mismos utilizando la

técnica de inmovilización de células. Para incrementar la producción de biogás en el tratamiento de residuos de panadería Potivichayanon et al²⁶, agregó un inóculo de *Pseudomonas aeruginosa* 2% (v/v) logrando así una mejora de un 33 % en el rendimiento del proceso.

V. CONCLUSIONES

- Se evidenció actividad lipolítica de *Pseudomonas aeruginosa* con la adición del inóculo 1×10^6 ufc/mL a las muestra recolectadas de aceite de desecho de locales de expendio de comida rápida demostrando así su utilidad en futuros procesos de tratamiento de efluentes grasos.
- La actividad de enzima que muestra el inóculo de *Pseudomonas aeruginosa* se ve influenciada por las condiciones (parámetros) a las cuales se ve sometida teniendo una máxima actividad de enzima 0,823U a las 24 h de cultivo con una temperatura de 37 °C y un pH de 7.
- La actividad de enzimática mejora significativamente a temperaturas superiores de 30°C ya que muestra una débil actividad (0,056 – 0,0385 U) a temperatura ambiente.
- La actividad enzimática muestra los mejores resultados (0,656- 0,823U) en medios neutros o ligeramente alcalinos (pH 7-8).

VI. **RECOMENDACIONES**

- Continuar el trabajo de investigación, teniendo como base los parámetros que nos dieron los mejores rendimientos.
- Continuar la investigación con otros tipos de bacterias o inclusive con mezclas de estas para que se complementen y regulen mutuamente así como mejoren los rendimientos en función al tiempo y residuos a tratar.
- Realizar pruebas pilotos a escala. Así poder predecir el comportamiento y proponer proyectos de mayor envergadura.
- Realizar trabajos de investigación similares, en el plano local y proponer parámetros que nos ayuden a mejorar los rendimientos en los procesos de tratamientos de residuos líquidos en general para así reducir el impacto frente a la naturaleza en especial los lechos marinos y acuíferos.

VII. **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Cisterna P. Eliminación de grasas y aceites por tratamiento biológico de fangos activos. Universidad de Oviedo Dpto de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente. 2001
2. MohdKhairul-Nizam MZ. Bioremediation of oil from domestic wastewater using mixed culture: effects of inoculum concentration and agitation speed [dissertation]. Malaysia: University Pahang Faculty of chemical and Natural Resources Engineering; 2008.
3. Abass OA, Ahmad TJ, Suleyman AM, Mohamed IAK and Md. Zahangir A. Removal of Oil and Grease as Emerging Pollutants of Concern (EPC) in Wastewater Stream. Engineering Journal 2011; 12(4): 161-169.
4. Lemus GR. Biodegradation and environmental impact of lipid-rich wastes under aerobic composting conditions [dissertation]. Vancouver: University of British Columbia Department of chemical and Biological Engineering; 2003.
5. Superintendencia Nacional de Servicios de Saneamiento (SUNASS). Usuarios de fuente de agua propia y usos de alcantarillado. Superintendencia Nacional de Servicios de Saneamiento; 2007. Informe N°014-2007/ SUNASS-120-F.
6. Superintendencia Nacional de Servicios de Saneamiento (SUNASS). Informe técnico de indicadores de las EPS 2013. Datos año 2012. Lima: Superintendencia Nacional de Servicios de Saneamiento; 2013. Informe N°172-2013/ SUNASS-120-F.

7. Fondo Nacional del Ambiente (FONAM). Oportunidades de mejoras Ambientales por el Tratamiento de Aguas Residuales en el Perú. Diciembre 2010.
8. Organization of American States. Programa regional de Desarrollo científico y tecnológico. Microbiología Industrial. 1994.
9. Facchin S, Diniz Alves P, De Faria Siqueira F. Biodiversity and secretion of enzymes with potential utility in wastewater treatment. J Ecol. 2013. 3(1): 34-47.
10. Mendoza CLI. Aislamiento y selección de hongos lipolíticos a partir de aceites vegetales de desecho (proveniente de frituras) utilizados en la elaboración de biodiesel [tesis]. UNMSM Facultad de Ciencias Biológicas; 2010.
11. Odeyemi AT, Aderiye BL, Bamidele OS. Lipolytic Activity of Strains of *Klebsiella*, *Pseudomonas* and *Staphylococcus spp.* from Restaurant wastewater and receiving stream. J. Microbiol Res. 2013, 3(1): 43-52.
12. Whiteley C.G, Lee D.J. Enzyme technology and biological remediation. Enz Microbial Technol. 2006; 38: 291–316.
13. Sirtori Norberto R, El tratamiento de efluentes líquidos y los procesos industriales. Un enfoque integrado e innovador. Rev. Conexiones. Universidad de la Cuenca del Plata. 2007-I
14. Terminology Services- Terminology and Acronyms report. United States Environmental Protection Agency. Jun 2010.
15. Volicheimer W, Scafatti L, Melendi D. Enciclopedia del Ambiente. Consejo Nacional de investigaciones científicas y técnicas de Argentina. Mendoza 1996.

16. Orellana J. Tratamiento de efluentes caracterización. Universidad Tecnológica Nacional. Bahía Blanca. Feb 2010.
17. Gonzalez D, Amaiz L, Medina L, Vargas R, Izzedin N. y Valbuena O. Biodegradación de residuo graso industrial empleando bacterias endógenas. Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal. 2012; 3(2): 105-118.
18. Lampoglia T. Sistemas de remoción de aceites por desagües no domesticos. Programa de agua potable y alcantarillado. Chiclayo .2001.
19. Chamy R, Rosenkranz F. Biodegradation life of Science. Ed. InTech 2013.
20. Jordening H, Winter J. Environmental Biotechnology. Concepts and Applications. Ed. Wiley Verlag. 2005.
21. Valencia E, Ramírez M, La industria láctea y la contaminación del agua. Rev Elementos 2009; 73: 27-31.
22. Montaña N, Sandoval A, Camargo S, Sanchez J. Los microorganismos: pequeños gigantes. Rev Elementos 2010; 77: 15-23.
23. Salgado R, Pineda G, Mesta A, Diaz F. Degradación de n-alcanos por *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1. Rev Inv Multidisciplinaria. 2008; 7: 123-132.
24. Bhumibhamon O, Kriangkrai P. Lipase-Producing Microorganisms for Use in Contaminated Fat and Oil Kitchen Wastewater Treatment. Kasetsart J Nat Sci. 2003; 37: 327-333.
25. Bharathi P, Elavarasi N, MohanaSundaram S. Studies on Rate of Biodegradation of Vegetable (Coconut) Oil by using *Pseudomonas aeruginosa*. International J Environ Biol. 2012; 2(1): 12-19.

26. Potivichayanon S, Sungmon T, Chaicongmao W, Kamvanin S. Enhancement of Biogas Production from Bakery Waste by *Pseudomonas aeruginosa*. World Academy of Science Engineering and Technology. 2011; 56: 529-532.
27. Cipinyte V, Grigiskis S, Baskys E. Selection of fat degrading microorganisms for the treatment of lipid-contaminated environment. Biologija. 2009; 55: 84-92.
28. Hasanuzzaman M, Umadhay-Briones KM, Zsiros SM, Morita N, Nodasaka Y, Yumoto I, Okuyama H. Isolation, Identification, and Characterization of a Novel, Oil-Degrading Bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* T1. Curr Microbiol. 2004; 49(2): 108-114.
29. Dhall p, Kumar R, Kumar A. Biodegradation of Sewage Wastewter Using autochthonous Bacteria. The Scientific World Journal. 2012; 1-8.
30. Matsumiya Y, Wakita D, Kimura A, Sanpa S, Kubo M. Isoaltion and Caracterización of a lipid –Degrading Bacterium and its Application to Lipid-Containing Wastewater Treatment. J Biosci and Bioengineering. 2007; 103(4): 325-330.
31. Spiers A.J., Buckling A. and Rainey P. B. The causes of *Pseudomonas* diversity. Microbiology. 2000; 146: 2345–2350.
32. Moore E.R.B., Tindall B.J., Martins Dos Santos V. A. P., Pieper D., Ramos J.L. and Palleroni N.J.. Nonmedical: *Pseudomonas*. Prokaryotes. 2006; 6: 646-703.
33. Peix A, Ramírez-Bahena MH, Velázquez E. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. Infect Genet Evol. 2009; 9(6): 1132-1147.

34. Palleroni NJ. *Pseudomonas* classification. A new case history in the taxonomy of gram-negative bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*.1994; 64 (4):231 -51.
35. Palleroni N. J. Prokaryote taxonomy of the 20th century and the impact of studies on the genus *Pseudomonas*: a personal view. *Microbiology* .2003; 149: 1–7.
36. De Vos P, Landschoot AV, Segers P, Tytgat R, Gillis M, Bauwens M, Rossau R, Goor M, Pot B, Kersters K, Lizzaraga P, and De Ley J. Genotypic relationships and taxonomic localization of unclassified *Pseudomonas* and *Pseudomonas*-like strains by deoxy-ribonucleic acid: Ribosomal ribonucleic acid hybridizations. *Int J Syst Bacteriol*.1989; 39: 35–49.
37. Ruiz ML. *Pseudomonas aeruginosa*: Aportación al conocimiento de su Estructura [tesis]. España: Universidad de Barcelona; 2007.
38. Llop A, Valdés M, Vivanco D, Zuazo J. Microbiología y Parasitología Médicas. Edit. Ciencias Médicas. La Habana. 2001; 303-305.
39. Palleroni NJ. The *Pseudomonas* story. *Environ Microbiol*. 2010; 12(6):1377-1383.
40. Hewitt JL. A comparative study of *Pseudomonas aeruginosa* strains [dissertation]. Indiana: University of Notre Dame Program of Bioengineering; 2010.
41. Prasad MP, Manjunath K. Comparative study on biodegradation of lipid-rich wastewater using lipase producing bacterial species. *Indian J Biotechnol*. 2011; 10: 121-124.

42. Martinez E, Martinez J. Microbios en línea [libro electrónico] Universidad Nacional Autónoma de Mexico.2004 [Consultado: 9 de noviembre de 2009]. Disponible en: <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios-/Cap3/>
43. Jaeger KE, Eggert T. Lipases for biotechnology. Curr Opin Biotechnol. 2002; 13(4):390-397.
44. Goldberg J, Hancock R, Parales R, Loper J. amd Cornelis P. *Pseudomonas* 2007 Meeting Review. Journal of Bacteriology. 2008; 190(8): 2649-2662.
45. García RM. Hidrólisis enzimática de triglicéridos en emulsiones o/w. Aplicación a formulaciones detergentes. Universidad de Granada Facultad de Ciencias Departamento de Ingeniería Química. 2005.
46. Verma N, Thakur S. and Bhatt A.K. Microbial Lipases: Industrial Applications and Properties. Int Res J Biological Sci. 2012; 1(8): 88-92.
47. Fernandez TL. Clonación Expresión y Evolución Molecular de La Lipasa I de *Galactomyces geotrichum*. España: Universidad de Granada Departamento de Biotecnología; 2005.
48. Fisher M, Pleiss J. The Lipase Engineering Database: a navigation and analysis tool for protein families. Nucleic Acids Research. 2003; 31(1): 319-321.
49. Nagar M., Kumar Dwivedi S., Shrivastava D. A Review on Industrial Application in Microbial Lipases. Int. J. of Pharm. & Research Sci. 2013; 2(4): 631-641.
50. Sharma D, Sharma B, Shukla AK. Biothechnological Approach of Microbial Lipase A Review. Biotechnol. 2011; 10(1): 23-40.

51. Schrag J.D, Cygler M. Lipases and the α/β fold. *Methods in Enzymology*. 1997 Vol 184, 85-106.
52. Arroyo SM. Síntesis de ácidos 2-aril-propiónicos homoquirales mediante esterificación enantioselectiva catalizada por lipasas inmovilizadas. Madrid Universidad Complutense Facultad de Farmacia Departamento de Química organica y Farmacéutica. 1995.
53. Ruiz RC. Microbial lipases with interest in biotechnology and infectious diseases: isolation, characterization and inhibition by natural substances. Universidad de Barcelona Facultad de Biología; 2005.
54. Jaeger KE, Dijkstra BW, Hertz MT. Bacterial Biocatalysts: molecular Biology, Three dimensional structures and biotechnological applications of lipases. *Ann Rev Microbiol*. 1999; 53: 315-351
55. Odile NM. Induction and Production of specific extracelular lipases from selected micriirganisms [dissertation]. Montreal: McGill University; Department of Food Science and Agricultural Chemistry; 2000.
56. De la Casa FR. Obtención y estabilización de lipasas de "*Candida rugosa*" utilización en medios orgánicos con a_w controlada [tesis doctoral]. Madrid: Universidad Complutense Facultad de Farmacia; 1999.
57. Lotti M, Monticelli S, Montesinos JL, Brocca S, Valero F, Lafuente J. Physiological control on the expression and secretion of *Candida rugosa* lipase. *Chem Phys Lipids*. 1998 Jun; 93 (1-2): 143-148.
58. Lotti M, Alberghina L.1996. *Candida rugosa* lipase isoenzymes. In FX Malcat (Ed). *Engineering of/with Lipases*. Kluwer Academic Publishers.
59. Alarcón VM. Producción de la lipasa Lip2 de *Candida rugosa* en el sistema *Pichia pastoris*: caracterización y aplicación en reacciones de

síntesis [tesis doctoral]. Barcelona: Universidad autónoma de Barcelona Departamento de Ingeniería Química; 2008.

60. Karigar CS. and Rao SS. Role of Microbial Enzymes in the Bioremediation of Pollutants: A Review. *Enzyme Research*. 2011, (1): 1-12.
61. Jegannathan KR., Nielsen PH. Environmental assessment of enzyme use in industrial production - a literature review. *J. Cleaner Prod*. 2013; 42: 228-240.
62. Hasan F., Ali-Shah A., Hameed A. Industrial applications of microbial lipases. *Enz Microb Tech*. 2006; 39(2): 235-251.
63. Girelli AM, Salvagni L, Tarola A. Use of lipase immobilized on cellulose for cleaning aged oil layers. *J Braz Chem Soc*. 2012; 23(4): 585-592.
64. Saifuddin N, Chua KH. Biodegradation of lipid-rich waste water by combination of microwave irradiation and Lipase immobilized on chitosan. *Biotechnol* 2006; 5(3): 315-323.
65. Sharma R, Chisti Y, Banerjee U. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol Adv*. 2001; 19(8): 627–662.
66. Ashok P, Benjamin S, Soccol C, Nigam P, Krieger N. and Soccol VT. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol. Appl. Biochem*. 1999; 29: 119–131.
67. Anobon C, Pinheiro A, De-Andrade R, Aguiéiras E, Andrade G, Moura M et al. From structure to catalysis: Recent developments in the Biotechnological applications of Lipases. *Biomed Res Inter*. [Revista en

línea] 2014: 1-11 [Consultado: 10 de Julio de 2014]. Disponible en:
<http://dx.doi.org/10.1155/2014/684506>

68. Cammarota MC, FreireD. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. *Biosource Technol.* 2006; 97 (17): 2195-2210.
69. Jeganathan J, Bassi A, Nakhla G. Pre-treatment of high oil and grease pet food industrial wastewaters using immobilized lipase hydrolyzation. *J. Hazardous Mater.* 2006; 137(1): 121-128.
70. Amarildo FE. Aguas residuales en el Perú, problemática y uso en la agricultura. En: Taller internacional de Uso de aguas residuales en agricultura. Lima: Autoridad Nacional del Agua- Ministerio de Agricultura; 2012
71. Ley General de Salud. Ley N°26842. Diario oficial El Peruano (20-07-1997)
72. Ley General del Ambiente Ley N°28611. Diario oficial El Peruano (15-10-2005)
73. Valores Máximos Admisibles. Decreto Supremo N°021-2009 Vivienda. Diario oficial El Peruano (20-11-2009)
74. Rojas R. Aplicación de la normatividad que regula los Valores MáximosAdmisibles (VMA) de las descargas de aguas residuales no domésticas. En: 1er Encuentro Nacional Pro-VMA. Lima: Sedapal; 2012.
75. Escalante RJ. Sedapal fiscalizara a tres mil empresas por tratamiento de agua. Diario El Comercio; 12 de septiembre de 2013.

76. Sánchez T. Aislamiento y selección de bacterias marinas productoras de lipasas y proteasas. Optimización de parámetros de crecimiento. [Tesis] Lima. UNMSM Facultad de Farmacia y Bioquímica. 2003.
77. Sharma K., Rathore M. Characterisation of Physical factors for optimum Lipase activity from some bacterial isolates. Inter J. Curr Trends Sci Tech. 2010; 1(2): 51-62.
78. Tembhurkar VR, Kulkarni MB, Peshwe SA. Optimization of Lipase production by *Pseudomonas sp.* In submerged bath process in shake flask culture. J Sci Res Reporter. 2012; 2(1): 46-50.
79. Kathiravan T, Marykala J, Sundaramanickam A, Kumaresan S, Balasubramanian T. Studies on nutritional requirements of *Pseudomonas aeruginosa* for lipase production. Adv Applied Sci Res, 2012, 3 (1): 591-598.
80. Zouaoui B, Bouziane A. Production, optimization and characterization of the lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. Rom Biotechnol Let.2012; 17(2): 7187-7193
81. Dharmsthiti S, Kuhasuntisuk B. Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LP602: biochemical properties and application for wastewater treatment. J Ind Microbiol. 1998; 21: 75-80.
82. Uscátegui Y, Jimenez J.,Suárez C, Prieto E. Evaluación de la inducción de enzimas lipolíticas a partir de una *Pseudomona aeruginosa* aislada del fruto de la Palma Africana (*Elaeis Guinensis*).Vitae Rev de la Facultad de Química Farmacéutica. 2012; 19(3): 280-286.

83. Bhumibhamon O, Jantana J, Fungthong S. Isolation and Characterization of *Pseudomonas* sp. KLB1 Lipase from High Fat Wastewater. *Kasetsart J Nat Sci.* 2003; 37(2): 176-185.
84. Bin-Basharudin H. Bioremediation of Oil contaminated wastewater using mixed culture [dissertation]. Malaysia: University Pahang Faculty of Chemical & Natural Resources Engineering; 2008.
85. Peña F. Aprovechamiento de aceites residuales del proceso de fritura como sustrato para el desarrollo de microorganismos productores de lipasas [Tesis]. Bogota: Universidad de la Sabana Facultad de Ingeniería; 2006.
86. Huanfei J. Pretreatment of Wastewater containing Fats and Oils using an immobilized Enzyme [dissertation]. Australia: Curtin University of Technology Department of Chemical Engineering; 2002.
87. Gupta R, Gupta N, Rath P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004; 64(6): 763-781.
88. Mongkolthanaruk W, Dharmsthiti S. Biodegradation of lipid-rich wastewater by a mixed bacterial consortium. *International. Biodeterioration & Biodegradation* 2002; 50: 101 – 105.
89. Bhumibhamon O, Kopraserstak A, Funthong S. Biotreatment of High Fat and Oil Wastewater by Lipase Producing Microorganisms. *Kasetsart J Nat Sci* 2002; 36: 261-267.

VIII. ANEXOS

Actividad Enzimática del inóculo (5% y 10%) evaluado en las diferentes condiciones de Tiempo, Temperatura, pH para la composición A de sales.

HOR/MED		24/A																	
TEMPERAT		AMB									33 °C								
% INÓCULO		5%			10%			5%			10%			5%			10%		
PH		6	7	8	6	7	8	6	7	8	6	7	8	6	7	8	6	7	8
NaOH (mL)		1,7	3,8	3,4	1,5	4,0	3,7	4,3	7,2	7,3	4,8	7,4	7,3	4,7	7,5	7,3	4,9	7,9	7,5
Act. Total		4,25	9,50	8,50	3,75	10,00	9,25	10,75	18,00	18,25	12,00	18,50	18,25	11,75	18,75	18,25	12,25	19,75	18,75
Unid. Lipasa		0,177	0,396	0,354	0,156	0,417	0,385	0,448	0,750	0,760	0,500	0,771	0,760	0,490	0,781	0,760	0,510	0,823	0,781

HOR/MED		48/A																	
TEMPERAT		AMB									33 °C								
% INÓCULO		5%			10%			5%			10%			5%			10%		
PH		6	7	8	6	7	8	6	7	8	6	7	8	6	7	8	6	7	8
NaOH (mL)		1,8	3,9	3,6	1,9	4,1	3,9	4,0	6,9	6,2	4,6	7,2	7,0	4,4	7,4	7,3	4,8	7,4	7,2
Act. Total		4,50	9,75	9,00	4,75	10,25	9,75	10,00	17,25	15,50	11,50	18,00	17,50	11,00	18,50	18,25	12,00	18,50	18,00
Unid. Lipasa		0,094	0,203	0,188	0,099	0,214	0,203	0,208	0,359	0,323	0,240	0,375	0,365	0,229	0,385	0,380	0,250	0,385	0,375

HOR/MED		72/A																	
TEMPERAT		AMB									33 °C								
% INÓCULO		5%			10%			5%			10%			5%			10%		
PH		6	7	8	6	7	8	6	7	8	6	7	8	6	7	8	6	7	8
NaOH (mL)		1,8	4,2	3,9	2,1	4,5	4,1	3,7	6,0	5,8	4,0	6,4	6,3	3,7	6,4	6,1	4,2	6,4	6,3
Act. Total		4,50	10,50	9,75	5,25	11,25	10,25	9,25	15,00	14,50	10,00	16,00	15,75	9,25	16,00	15,25	10,50	16,00	15,75
Unid. Lipasa		0,063	0,146	0,135	0,073	0,156	0,142	0,128	0,208	0,201	0,139	0,222	0,219	0,128	0,222	0,212	0,146	0,222	0,219

Actividad Enzimática del inóculo (5% y 10%) evaluado en las diferentes condiciones de Tiempo, Temperatura, pH para la composición B de sales.

HOR/MED	24/B														
	AMB					33 °C					37 °C				
	5%		10%			5%			10%			5%			10%
PH	6	7	8	6	7	8	6	7	8	6	7	8	6	7	8
NaOH (mL)	1,3	3,0	2,8	1,3	3,1	2,9	3,0	6,7	5,6	3,3	6,3	6,4	3,9	7,1	6,5
Act. Total	3,25	7,50	7,00	3,25	7,75	7,25	7,50	16,75	14,00	8,25	15,75	16,00	9,75	17,75	15,25
Unid. Lipasa	0,135	0,313	0,292	0,135	0,323	0,302	0,313	0,698	0,583	0,344	0,656	0,667	0,406	0,740	0,635

HOR/MED	48/B														
	AMB					33 °C					37 °C				
	5%		10%			5%			10%			5%			10%
PH	6	7	8	6	7	8	6	7	8	6	7	8	6	7	8
NaOH (mL)	1,4	2,9	2,9	1,3	3,3	3,0	3,0	6,1	5,6	3,3	6,5	6,1	4,2	7,0	6,0
Act. Total	3,50	7,25	7,25	3,25	8,25	7,50	7,50	15,25	14,00	8,25	16,25	15,25	10,50	17,50	15,00
Unid. Lipasa	0,073	0,151	0,151	0,068	0,172	0,156	0,156	0,318	0,292	0,172	0,339	0,318	0,219	0,365	0,313

HOR/MED	72/B														
	AMB					33 °C					37 °C				
	5%		10%			5%			10%			5%			10%
PH	6	7	8	6	7	8	6	7	8	6	7	8	6	7	8
NaOH (mL)	1,6	3,6	3,3	1,5	3,6	3,3	2,9	5,9	5,1	3,1	5,7	4,9	3,3	6,0	5,2
Act. Total	4,00	9,00	8,25	3,75	9,00	8,25	7,25	14,75	12,75	7,75	14,25	12,25	8,25	15,00	13,00
Unid. Lipasa	0,056	0,125	0,115	0,052	0,125	0,115	0,101	0,205	0,177	0,108	0,198	0,170	0,115	0,208	0,181